

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462970

研究課題名(和文) 低出力レーザー照射による関節リウマチの遺伝子発現の抑制

研究課題名(英文) Suppression of low-level laser irradiation on gene expression in rheumatoid arthritis

研究代表者

久保山 昇 (KUBOYAMA, Noboru)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：10102576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)は、関節破壊を引き起こす自己免疫疾患である。コラーゲン誘発性関節リウマチ(CIA)ラットの膝滑膜細胞からmRNAを回収して、遺伝子変動を解析し、低出力レーザー照射(LLLI)および発光ダイオード照射(LED1)による炎症抑制の解明を試みた。CIAのCXCL13遺伝子発現が増大し、LLLIおよびLED1はCXCL13, MMP3遺伝子発現を有意に減少させた。LED1は骨膜挙上モデルラットの新生骨、骨塩量、骨梁体積率値を有意に増加させた。LLLIは糖尿病モデルラットの唾液腺のNF- κ Bのリン酸化および核移行を低下させ、HMGB1の転写への誘導を軽度抑制して細胞増殖を促進した。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory joint disorder, the progression of which leads to the destruction of cartilage and bone. Low-level laser irradiation (LLLI) and light-emitting diodes irradiation (LED1) are currently being evaluated for the treatment of collagen-induced RA (CIA) rats. CIA caused swelling of rat joints, and LLLI significantly decreased the swelling, and LLLI and LED1 significantly decreased the CXCL13, MMP3 mRNA level. Micro-CT assessment of LED1 on new bone formation in an experimental rat calvaria periosteal elevation model. LED1 increased BMC, and BV/TV in LED-treated new bone formation of the inner cavity of the PTFE ring compared with controls. A single intraperitoneal injection of streptozotocin was administered to develop a diabetic rat model. The LLLI-induced anti-inflammatory effect was associated with up-regulation of HMGB1 expression and function.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：低出力レーザー照射 関節リウマチ 骨梁体積率 実験動物用マイクロX線CT リウマチ発症因子 骨吸収 転写因子 海綿骨

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは国民のおよそ1%が罹患する頻度の高い進行性の疾患で、関節破壊により運動障害を来し、長期の治療を必要とする難病である。全身の関節で、慢性増殖性滑膜炎が発生し、滑膜細胞や滑膜に進潤した炎症細胞に由来する多くの因子によって関節軟骨・骨破壊が進行する。それらのリウマチ発症因子は関節リウマチの滑膜細胞によって大量に産生されることから、関節リウマチに特異的な関節破壊因子として注目されている。すでに我々は、実験動物用マイクロX線CT (μ CT) 装置を用いて、骨の3次元断層像を基にした海綿骨の3次元微細構造の解析を行っており、低出力レーザー (LLL) 照射は、CIAラットの踵・膝関節の骨糜爛と骨吸収を有意に抑制し、この膝滑膜組織からリウマチ発症因子の遺伝子発現をCIAラットで増大し、LLL照射により有意に抑制し、血清中IL-1 β 、IL-6、CRPおよびMMP-3の上昇を有意に抑制することを明らかにした。

また、最近の研究で、この膝滑膜組織を採取し、DNAマイクロアレイを応用して遺伝子発現の変動を解析し、関節リウマチによるIL-1 β 、IL-6、CCL2およびIntercellular Adhesion Molecule-1(ICAM1-1)の遺伝子発現の上昇をLLL照射によって減少したことを報告した。IL-1 β 、IL-6およびIL-20は炎症促進因子であり関節リウマチの発症や悪化に関与する遺伝子であることから、LLL照射によるこれらの炎症促進因子発現の抑制は、関節リウマチの炎症・疼痛の抑制機序の一つである。

また、糖尿病による唾液腺の機能低下は唾液中の成長因子や抗菌物質などの有用物資の産生低下を引き起こして口腔疾患だけでなく全身疾患にも波及し、高齢者のQOLの維持を脅かしている。

本研究では、CIA 関節リウマチモデルの発症による、踵・大腿骨の骨梁微細構造、骨吸収部位の破骨細胞分化促進因子および破骨

細胞分化抑制因子発現の変化を免疫組織学的に検討する。また、主要遺伝子発現を解明に関しては、DNA マイクロアレイを用いて、光線治療法による作用機序の詳細と安全な光線治療法の基盤を探索する。さらに、糖尿病ラット顎下唾液腺における低出力レーザー治療の影響についても検討した。

2. 研究の目的

関節滑膜および顎骨を病変の主候とする慢性炎症性疾患で、滑膜炎の進行とともに骨・関節の破壊が進行する。これらに共通する点は、炎症・リウマチ発症因子である。

CIAラットの踵・膝関節の腫脹をLLL照射により抑制し、リウマチ発症因子の発現を低下したことを明らかにした。これまで、炎症性骨疾患に伴う骨破壊の病態はほとんど不明であったが、破骨細胞分化活性化及びその抑制機構が解明され、それを標的とすることで、新たな治療戦略が生まれる可能性が出てきた。

本研究では、LLL 照射および LED 照射によるリウマチ発症因子の遺伝子発現を網羅的に解明し、関節リウマチに関与するリウマチ発症因子や、免疫系による骨代謝制御、および糖尿病ラット顎下唾液腺における低出力レーザー治療の影響に関してさらに解明する。

3. 研究の方法

関節リウマチモデルである2型コラーゲン誘発性関節リウマチ (CIA) ラットおよびマウスを用いて、LLL 照射および発光ダイオード(LED)照射による抗炎症作用を検討した。実験動物用マイクロ X 線 CT (μ CT) 装置による、骨の3次元断層像を基にした海綿骨の3次元微細構造の解析を行った。

LED 群は、波長 570 nm (LED-570) および

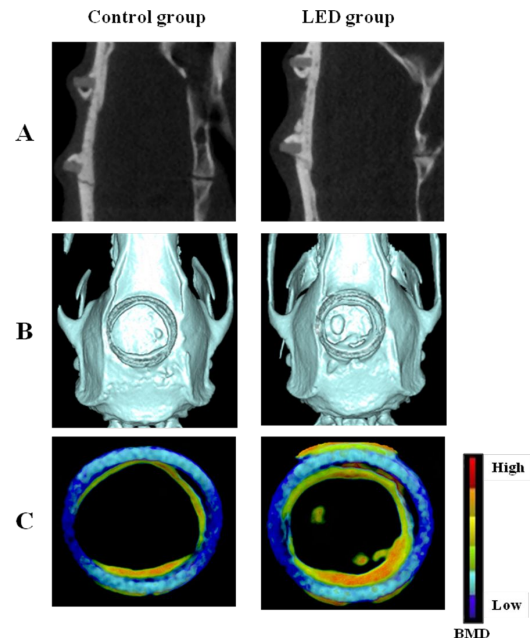
波長 950 nm (LED-940)、照射時間 500 秒としそれぞれ総照射エネルギー密度は 5 J/cm^2 で 1 週間に 3 回、8 週間膝関節部位に照射した。骨膜挙上モデルラットを用いて、発光ダイオード (LED) 照射による新生骨形成を検討した。ラット頭蓋骨の骨膜下にポリテトラフルオロエチレン (PTFE) リングを埋入し、実験的骨膜挙上ラットを作製した。LED 照射群には、波長 850 nm、総照射エネルギー 8 J、照射時間 250 秒とし 1 週間に 3 回、頭頂骨部位に照射した。糖尿病ラット顎下唾液腺における低出力レーザー治療の影響に関して、我々は STZ によって実験的糖尿病モデルラットを作製し、LLL 照射による顎下腺の機能回復の有効性を遺伝子レベルで検討した。

4. 研究成果

CIAラットを用いて、 μ CT装置による、骨の3次元断層像を基にした海綿骨の3次元微細構造の解析を行っており、LLL照射は、CIAラットの踵・膝関節の骨糜爛と骨吸収を有意に抑制し、この膝滑膜組織からリウマチ発症因子の遺伝子発現をCIAラットで増大し、LLL照射により有意に抑制し、血清中IL-1 β 、IL-6、CRPおよびMMP-3の上昇を有意に抑制することを明らかにした。また、LLL照射は、CIAラットおよびヒト関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞(MH7A)に対して、を用いて、LLL照射は、リウマチ発症因子の遺伝子であるIL-20遺伝子およびIL-1 β の表現を有意に抑制したことを明らかにした。さらに、関節リウマチモデルであるCIAマウスを用いて、LED照射による抗炎症作用を検討し、CIA発症後4週目のLED-570、LED-940群の腫脹抑制率 $18.1 \pm 4.9\%$ 、 $29.3 \pm 4.0\%$ を示した、LED-940照射は、CIAマウスの血清中IL-1 β 、IL-6およびMMP-3の上昇を有意に抑制することを明らかにした。

骨膜挙上モデルラットを用いて、発光ダイ

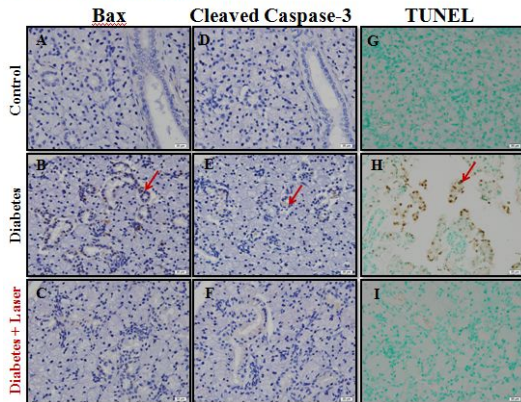
オード(LED)照射による新生骨形成を検討した。ラット頭蓋骨の骨膜下にポリテトラフルオロエチレン(PTFE)リングを埋入し、実験的骨膜挙上ラットを作製した。



PTFEリング内の新生骨は、LED照射群は時間に依存して増加し、骨塩量、骨梁体積率および骨密度値も増加した。また、1および3カ月ともにLED照射群は対照群より有意に高値を示した。組織学的所見では、LED照射群は対照群より新生骨を多く観察した。

糖尿病ラット顎下唾液腺における低出力レーザー治療の影響に関してSTZ誘発の糖尿病モデルラットを作製し、LLLによる顎下腺の機能回復の有効性を遺伝子レベルで検討した結果、糖尿病の唾液腺の上皮細胞でのLLLによる細胞増殖のメカニズムは、NF- κ B経路の活性化発現を低下させた。また、NF- κ Bのリン酸化および核移行の発現を低下させ、受容体RAGEへの結合をダウンレギュレートする。これを、LLLは炎症マーカー、TNF- α 、HMGB1とRAGEの転写への誘導を軽度抑制した。さらに、LLLは、ERKと共に、セリン133でのcAMP蓄積、およびCREBのリン酸化を増加させ、サイクリンD1の蓄積をもたらし、細胞増殖を促進することを明らかにした。

Figure 5. LLLT prevented apoptosis



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

N Kuboyama, M Ohta, Y Sato, Y Abiko: Anti-inflammatory activities of light emitting diode irradiation on collagen-induced arthritis in mice. Laser Therapy, 査読有, 23(3), 2014, 191-199.

A Imaoka, L Zhang, N Kuboyama, Y Abiko: Reduction of IL-20 expression in rheumatoid arthritis by linear polarized infrared light irradiation. Laser Therapy, 査読有, 23(2), 2014, 109-114.

久保山昇, U. K. Bhawal, 内田僚一郎, 金田明, 安孫子直光: 骨膜挙上モデルラットに対する LED 照射による新生骨形成の Micro-CT 解析、骨日本レーザー医学誌, 査読有, 35 卷(2), 2014, 151-157.

<http://www.jslsm.or.jp/>

〔学会発表〕(計7件)

Bhawal UK, Fukuoka CY, Simões A, Kuboyama N: DNA microarray and microRNA analysis in low-level laser therapy (LLLT)-treated diabetic rat salivary glands. The 1st IDR, 2015, Oct, 26-30, Kyoto.

UK Bhawal, CY Fukuoka, A Simoes, N kuboyama: Low-level laser therapy (LLLT) reduced diabetes-induced inflammation in

rat salivary glands. The 33rd Korea

IADR, 2014, Nov, 22-25, Korea.

Bhawal UK, Fukuoka CY, Simões A,

Kuboyama N: Diabetes-induced

dysregulation of cAMP/CREB signaling and

correlations with LLLT. The 102th FDI,

2014, Sep, 11-14, India.

久保山昇: 低出力レーザー照射による実

験的関節リウマチに対する治療効果. 第

26 回日本レーザー治療学会・シンポジウ

ム, 2014, 6.28, 東京

CY Fukuoka, U K Bhawal, A Simoes, VE

Arana-Chavez, N Kuboyama, and Y

Abiko: Diabetes-induced dysregulation of

cAMP/CREB signaling and correlations with

LLLT. The 92rd AADR, 2014, MAR

19-22, Charl.

CY Fukuoka, U K Bhawal, A Simoes, VE

Arana-Chavez, N Kuboyama, and Y Abiko:

Effects of Laser Therapy on Diabetic Rat

Salivary Glands, The 2nd IADR-Asia 2013,

21-23, Aug, Thailand.

CY Fukuoka, Bhawal Ujjial, 久保山昇,

安孫子直光: A critical role for low-level

laser therapy in regulating submandibular

glands of streptozotocin-induced diabetic rats.

第 25 回日本レーザー歯学会総会,

2013, Sep. 28-29. 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保山 昇 (KUBOYAMA Noboru)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：10102576

(2) 研究分担者

バワール ウジャーラ (BHAWAL Ujjal)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号：50433339

(3) 研究分担者

安孫子 宜光 (ABIKO Yoshimitsu)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：70050086